



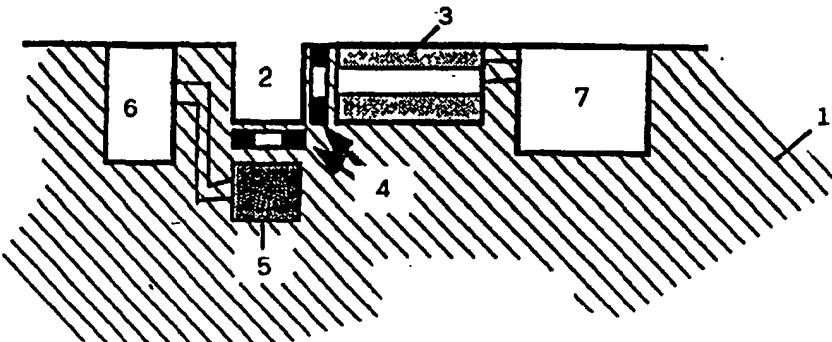
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G02B 21/00, G01N 21/64		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/13744 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Mai 1996 (09.05.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/04213 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Oktober 1995 (26.10.95)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: P 44 38 391.6 27. Oktober 1994 (27.10.94) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529 Hamburg (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GÜNTHER, Rolf [DE/DE]; Oelkerallee 41, D-22769 Hamburg (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETERMINING SUBSTANCE-SPECIFIC PARAMETERS OF ONE OR A PLURALITY OF MOLECULES BY CORRELATION-SPECTROSCOPY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG STOFFSPEZIFISCHER PARAMETER EINES ODER WENIGER MOLEKÜLE MITTELS KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE

(57) Abstract

The invention concerns a method of determining substance-specific parameters of one or a plurality of molecules by correlation-spectroscopy, the molecule(s) in a sample containing a relatively high concentration of the molecule(s) to be determined being excited by electromagnetic radiation (exciting radiation) in order to emit electromagnetic radiation (emission radiation). The exciting and/or emission radiation passes through a device which is permeable to the corresponding wavelength of this electromagnetic radiation, said device being disposed between an exciting or emission radiation source and an exciting or emission radiation detector. In order to permit the passage of electromagnetic waves, this device comprises at least one area whose greatest extension in at least one spatial direction is shorter than the wavelength of the exciting and/or emission radiation of the molecule(s).



(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung stoffspezifischer Parameter eines oder weniger Moleküle mittels Korrelations-Spektroskopie, wobei das Molekül in einer Probe, in der das (die) zu bestimmende(n) Molekül(e) in relativ hoher Konzentration vorhanden ist (sind), oder die Moleküle durch elektromagnetische Strahlung (Excitationstrahlung) zur Abgabe von elektromagnetischer Strahlung (Emissionsstrahlung) angeregt wird oder werden, wobei die Excitations- und/oder Emissionsstrahlung eine für die entsprechende Wellenlänge dieser elektromagnetischen Strahlung durchlässige Einrichtung passiert, die zwischen einer Excitations- oder Emissionsstrahlungsquelle und einem Excitations- oder Emissionsstrahlungsdetektor angeordnet ist, wobei die Einrichtung zum Durchlassen elektromagnetischer Wellen mindestens einen Bereich aufweist, dessen größte Ausdehnung in mindestens einer Raumrichtung kleiner ist als die Wellenlänge der Excitations- und/oder Emissionsstrahlung des Moleküls oder der Moleküle.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung stoffspezifischer Parameter eines oder weniger Moleküle mittels Korrelations-Spektroskopie

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung stoffspezifischer Parameter eines oder weniger Moleküle mittels Korrelations-Spektroskopie, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Die WO 94/16313 beschreibt die Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) als Untersuchungsmethode. Durch eine konfokale Anordnung können extrem kleine Volumenelemente in einer Probe verschiedenster stofflicher Zusammensetzung untersucht werden. Durch Messung der spektroskopischen Parameter einzelner oder weniger Moleküle lassen sich somit Aussagen gewinnen, die Rückschlüsse auf die stoffliche Zusammensetzung dieser kleinen Volumenelemente erlauben. Diese Methode benötigt jedoch relativ niedrige Konzentrationen der zu untersuchenden Moleküle. Möchte man die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie auf Systeme übertragen, in denen relativ hohe Konzentrationen des zu messenden Moleküls herrschen, stößt die Methode an ihre Grenzen, da dann eine Fluktuationsanalyse nicht mehr möglich ist. Sind beispielsweise bei einem Meßvolumen von 10^{-14} l, Konzentrationen von mehr als 1 μm der zu untersuchenden

- 2 -

Moleküle vorhanden, ist die bislang angewendete Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ungeeignet.

Aus Fischer (J. Opt. Soc. Am. B., Vol. 3, No. 10, pp. 1239 - 1244, October 1986) ist bekannt, daß das Konzept der "surface-enhanced fluorescence spectroscopy" anwendbar ist, um kleine Änderungen in den optischen Eigenschaften der Mikroumgebung eines einzelnen kleinen Streuobjektes zu detektieren. Submikrometeröffnungen in dünnen, auf einem Objektträger aufgebrachten Silber- oder Goldfilmen werden hier verwendet, um die Eigenschaften der zu untersuchenden Lösung zu analysieren.

Srivastava und Badyopadhyay (Rev. Sci. Instrum. 61 (2), 1990) beschreiben eine Vorrichtung zur Messung der Photolumineszenz, welche optische Fasern verwendet, um die Excitations- und Emissionsstrahlung zu leiten. Dieses Spektrometer wird eingesetzt, um Photolumineszenzspektren mehrerer III-V-Komponenten zu bestimmen.

Miniaturisierte Untersuchungssysteme sind z. B. in DD 271 953 A1 beschrieben. Eine Einrichtung zur automatischen photometrischen Analyse kleinster Probenmengen, mit der Transmissions- (Extinktions-) und Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden können, ist dort offenbart. In einem Träger sind Wellenleiterbahnen implementiert, die mit ihrer Oberfläche zumindest in Abschnitten im optischen Kontakt mit mindestens einer Probe stehen. Für jede Wellenleiterbahn sind in dem Träger implementierte Mittel zur Einkopplung elektromagnetischer Strahlung in die Wellenleiterbahnen vorgesehen. Zur Integration in periphere Technik ist der Träger auf einem Transportmittel befestigt, das einen Kontakt mit Mitteln zur Probenvorbereitung und Nachbehandlung herstellt.

Keines der beschriebenen Verfahren ermöglicht jedoch die Erweiterung der Meßgrenzen der Korrelations-Spektroskopie zu höheren Konzentrationen. Insbesondere ist auch keine

miniaturisierte Vorrichtung zur Durchführung der Korrelations-Spektroskopie vorbeschrieben. Eine derartige Vorrichtung ist für die moderne Biotechnologie, insbesondere die evolutive Biotechnologie, wünschenswert.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht somit darin, ein leistungsfähiges Untersuchungssystem zu entwickeln, welches die Bestimmung stoffspezifischer Parameter von Molekülen in relativ hochkonzentrierten Lösungen mittels der Korrelations-Spektroskopie, insbesondere der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, ermöglicht. Dieses Untersuchungssystem sollte miniaturisierbar sein.

Überraschenderweise wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung stoffspezifischer Parameter eines oder weniger Moleküle in einer Probe, in der das (die) zu bestimmende(n) Molekül(e) in relativ hoher Konzentration vorhanden ist (sind), wobei das Molekül oder die Moleküle durch elektromagnetische Strahlung (Excitationsstrahlung) zur Abgabe von elektromagnetischer Strahlung (Emissionsstrahlung) angeregt wird oder werden, wobei die Excitations- und/oder Emissionsstrahlung eine für die entsprechende Wellenlänge dieser elektromagnetischen Strahlung durchlässige Einrichtung passiert, die zwischen einer Excitations- oder Emissionsstrahlungsquelle und einem Excitations- oder Emissionsstrahlungsdetektor angeordnet ist, wobei die Einrichtung zum Durchlassen elektromagnetischer Wellen mindestens einen Bereich aufweist, dessen größte Ausdehnung in mindestens einer Raumrichtung kleiner ist als die Wellenlänge der Excitations- und/oder Emissionsstrahlung des Moleküls oder der Moleküle.

Dem erfindungsgemäßen Verfahren liegt das Prinzip der optischen Nahfeldmikroskopie zu Grunde. Normalerweise kann ein Lichtstrahl nicht auf einen Durchmesser fokussiert werden, der seine Wellenlänge wesentlich unterschreitet. Trifft er aber auf eine entsprechend kleine Blende, dringt

das elektromagnetische Feld durch die Öffnung hindurch, klingt aber in weiterer Entfernung von der Blende sehr schnell ab.

Die erfindungsgemäß zu verwendende, für elektromagnetische Strahlung durchlässige Einrichtung weist vorzugsweise Bereiche in Form von Lochblenden oder Spaltblenden auf. Die Einrichtung weist insbesondere Bereiche auf, die durch Lichtleiter mit fokussierenden optischen Elementen, wie Mikrolinsen, Gradientenindexlinsen oder binären optischen Elementen optisch koppelbar und/oder in den Lichtleiter integrierbar sind.

Sowohl das Anregungslicht als auch das emittierte Licht kann durch Lichtleiter gefiltert werden, insbesondere in Kombination mit fokussierenden Elementen. Das emittierte Licht, insbesondere das Fluoreszenzlicht, kann in einem derartigen Aufbau entweder über die gleiche Glasfaser wie das Anregungslicht - versehen mit einem Strahlenteiler - oder nach Einkopplung in einen weiteren Lichtleiter, einem geeigneten Detektor zugeführt werden.

Als Lichtquelle wird vorzugsweise ein Laser benutzt. Das Licht dieses Lasers wird durch eine Blende oder das "getaperte" (d.h. verjüngte) Ende einer Faser, deren Hülle optisch undurchlässig beschichtet ist, auf ein kleines Volumenelement fokussiert. Die Probe wird vorzugsweise in einer Durchflußkapillare oder einer stehenden Lösung (batch) gemessen. Zweidimensionale Anordnungen dieser "batches" sind vorzugsweise in Wafer angeordnet, wie sie in P 43 22 147.5 beschrieben sind. Direkt an die Probenkammer schließt sich ein weiterer Spalt oder das getaperte Ende einer zweiten Faser an, der/das das Fluoreszenzlicht über einen geeigneten Filter auf das Detektorelement überträgt. Durch die Verwendung von fokussierenden Elementen kann die Qualität des Lichtstrahles verbessert werden, und eine Anordnung realisiert werden, die den gleichen Lichtweg für Anregung und

Detektion benutzt. Dabei sind auch Kombinationen mit der herkömmlichen FCS denkbar, z.B. die Anregung mit der beschriebenen Faser und die Detektion über ein gewöhnliches Mikroskopobjektiv, oder umgekehrt.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind insbesondere:

- a) höhere Konzentrationen sind meßbar;
- b) der Fokus eines Nahfeldmikroskopes ist wesentlich kleiner als der eines konventionellen Mikroskops (ca. 50 bis 100 nm gegenüber > 300 nm). Damit werden die Diffusionszeiten der Moleküle durch das Meßelement kürzer und entsprechend geringere Meßzeiten ermöglicht;
- c) getaperte Fasern sind preisgünstiger als Mikroskop-objektive herzustellen;
- d) je nach Durchmesser des Faserendes können evtl. mehrere Fasern um das Meßvolumen, in dem das zu messende Molekül oder Moleküle vorhanden ist, gruppiert werden und erlauben so die Anregung oder Detektion bei verschiedenen Wellenlängen unter Verwendung einer Faser pro Wellenlänge;
- e) es können mehrere Fasern gleichzeitig in beliebiger räumlicher Anordnung zueinander eingesetzt werden.
- f) der kleinere Fokus führt zu einem geringeren Einfluß des Photobleichens ("Photobleaching") der Farbstoffmoleküle auf die Korrelationsfunktion. Dieser Vorteil kommt umso stärker zum Tragen, je langsamer die beobachteten Partikel diffundieren.

Eine weitere der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, das Untersuchungssystem in miniaturisierter Ausführung bereitzustellen.

In der Optoelektronik verwendete Laser- und Leuchtdioden (LDs und LEDs) sind miniaturisierbar und lassen sich somit in

geeigneter Weise als Lichtquelle benutzen. Vorzugsweise wird die Excitationsstrahlung von einer Einheit geliefert, die ein Halbleiterlaser, ein frequenzvervielfachter Halbleiterlaser ist. Insbesondere werden Vorrichtungen bevorzugt eingesetzt, die mittels Wellenleitern, wie Glasfasern, verstärkte Lichtpulse liefern. Dazu gehören insbesondere Erbium-dotierte Glasfasern. Über einen miniaturisierten, getaperten Lichtwellenleiter wird somit das aus der aktiven Schicht ausgekoppelte Licht auf ein kleines Volumenelement fokussiert. Hierzu können ggf. zusätzlich Loch- oder Spaltblenden eingesetzt werden. Der Detektor wird hinter einer ähnlichen Optik plaziert, so daß die Foci übereinstimmen (konfokal). Der Winkel, unter dem die Anregungs- und Detektoroptik plaziert werden, ist dabei beliebig einstellbar. Besonders bevorzugt ist die Messung der Emissionsstrahlung von einer Detektionseinheit, wie einer als Photodiode geschalteten pin-Schicht, Lawinenphotodioden oder Photomultiplier. Für den Röntgenbereich werden Si:Li, Ge:Li-Detektoren eingesetzt.

Unter Verwendung all dieser Elemente läßt sich eine FCS-Apparatur aufbauen, deren Komponenten auf einem Chip zusammengefaßt werden können und die mit den üblichen Mikrostrukturfertigungsverfahren hergestellt werden kann.

Neben den genannten Lichtquellen und Detektoren kommen refraktive oder diffraktive optische Elemente in Frage, die ähnlich wie Linsen Licht fokussieren. Die Apparatur kann somit sowohl mit konventioneller als auch mit Nahfeldoptik ausgelegt werden. Es kann völlig auf den Einsatz eines Mikroskopes verzichtet werden.

Für die Mikro-FCS-Varianten sind einander ähnliche Anordnungen möglich:

- a) Senkrecht zum einfallenden Fluoreszenzlicht werden ein

oder zwei Detektoren angebracht.

- b) In Durchstrahlrichtung des Anregungslichtes alternativ ein zusätzlicher Detektor zur unter a) genannten Variante, oder dieser Detektor einzeln stehend, jeweils in Kombination mit einem geeigneten Filter.
- c) Anordnung einer Vielzahl von Detektoren entlang einer Durchflußkapillare. Die Detektoren können so abgestimmt werden, daß die überlagerte Flußgeschwindigkeit in der Kapillare gerade kompensiert wird. Es ist auch möglich, in dieser Variante die ganze Kapillare auszuleuchten und die Beschränkung auf das kleine Raumvolumen nur durch die Detektoroptik vorzunehmen.
- d) Ein sternförmig um die Kapillare angebrachtes Detektorarray, dem das Fluoreszenzlicht mittels Lichtleitern zugeführt wird. Das Fluoreszenzlicht kann mittels eines Mikrolinsenarrays in die Fasern eingekoppelt werden.

Die Vorteile dieser Varianten sind:

1. Deutliche Verringerung der notwendigen Anzahl an Bauteilen.
2. Leichte Möglichkeit zum Aufbau einer parallelen FCS-Einheit.
3. Aus den verringerten Dimensionen ergibt sich eine Handhabbarkeit der FCS als Tischgerät, evtl. selbst als hochparallele Anlage.
4. Detektoranordnung nach lit c) ermöglicht die Analyse der zeitlichen Fluoreszenzänderung einer Probe.
5. Die sternförmige Detektoranordnung ermöglicht bei Verwendung mehrerer Lichtquellen die Miniaturisierung der Kreuzkorrelation.
6. Stark verringerte Produktionskosten in der Serienfertigung.
7. Die Integration eines derartig miniaturisierten FCS-Aufbaus in durch Mikrosystemtechnik geschaffenen Systemen (Flußreaktor, Peptidparallel-Synthese) ist realisierbar.

8. Reduktion der Streukapazität an Verstärkern und Regel-elektronik durch die Integration dieser Einheiten direkt auf dem Chip. Damit einhergehend eine wesent-liche Empfindlichkeitssteigerung der Meß-Elektronik.

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet vorzugsweise als elektromagnetische Strahlung der Emission und/oder Excitation solche mit Frequenzen, die im typischen Bereich der Chemi-lumineszenz, Kernfluoreszenz und Röntgenfluoreszenz liegen.

Erfindungsgemäß kann auch die Wechselwirkung der Chemi-lumineszenz über Koppelung mit anderen physikalischen Effekten wie kernmagnetische Resonanz, allgemein elektrischen, magnetischen und elektromagnetischen Feldern (Spektrallinienauflösung), Frequenzverdoppelung (SHG), Summen- und Differenzfrequenz, Vibrationseffekte, Koppelung mit Phononen der umgebenden festen Phase beispielsweise Oberflächenplasmonen als Emissionsstrahlung gemessen werden, oder einer Kombination mit atomic force microscopy erfolgen.

Eine bevorzugte Anordnung der FCS ist die Fokussierung des Beobachtungsgebietes auf ein kleines Volumenelement, in dem einzelne Photonen gezählt und mittels Korrelationsanalyse ausgewertet werden. Es ist dabei nicht zwingend, daß die Photonen aus der Fluoreszenz eines Moleküls stammen. Für diesen Zweck können auch andere Quellen dienen. Zum Beispiel kann die Fluoreszenzlösung durch Elektronenspinresonanz an einem Einzelmolekül nachgewiesen werden. Darüberhinaus sind weitere Prozesse einsetzbar, um Photonen zu liefern. Dafür kommen nichtlineare optische Effekte (Frequenzver-doppelung oder -verdreifachung (SHG oder THG), Summen- und Differenzfrequenz) in Frage. Die für eine effiziente Ausbeute nötigen Energiedichten sind in kontinuierlicher Anregung zwar schwer erreichbar, und könnten auch zu einer schnellen Zerstörung des Farbstoffes führen. In der P 43 42 703 ist aber die Verwendung einer hochfrequent gepulsten Lichtquelle beschrieben. Damit lassen sich die vorstehend genannten

Probleme vermeiden:

Eine andere Quelle der Emissionsstrahlung stellt die Elektro-chemilumineszenz dar. Dafür ist es bevorzugt, eine Elektrode nahe dem Beobachtungsvolumen anzubringen.

Die Entwicklung einer geeigneten FCS-Apparatur zur Ausnutzung innerer Niveaus erlaubt einen kleineren Fokus durch die verwendete geringere Wellenlänge. Auch wird gegebenenfalls sogar die Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden Species überflüssig. Zweckmäßigerweise wird man dazu Wellenlängen im sogenannten "Wasserfenster" (Zwischen 284 und 543 eV) zur Anregung auswählen. In diesem Wellenlängenbereich ist Wasser transparent (keine Absorption durch Sauerstoff), während organische Substanzen über den enthaltenen Kohlenstoff absorbieren.

Vorzugsweise ist eine Anzahl von Detektoren so angeordnet, daß das als Quelle der Emissionsstrahlung dienende Molekül bei Passieren der Detektoren in zeitlicher Korrelation mit dem Passieren beobachtet wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich insbesondere mit einer Vorrichtung durchführen, die eine auf einem Substrat angeordnete Excitationsstrahlungsquelle, eine im Strahlengang der Excitations- und/oder Emissionsstrahlung befindliche für die entsprechende Wellenlänge dieser elektromagnetischen Strahlung durchlässige Einrichtung, einen Detektor für elektromagnetische Strahlung, die insbesondere durch Emission hervorgerufen wird und elektronische Schaltelemente, gegebenenfalls mit Auswertungseinheiten zur Analyse emittierter elektromagnetischer Strahlung aufweist.

In einer bevorzugten Ausführung besteht das Substrat aus einem Wafer eines in der Mikroelektronik verwendeten Materials (etwa Si, SiO₂, Si₃N₄, GaAs). Die für die Steuerung

des Lasers und für die Auswertung des Meßsignals benötigte Elektronik wird bei dieser Variante monolithisch in den Wafer integriert. Insbesondere kann es sich bei dem Substrat auch um ein piezoelektrisches Element handeln.

Vorzugsweise ist der Detektor als Photodetektor ausgestaltet und am Boden eines das Substrat durchziehenden Kanals angeordnet. Die Excitationsstrahlungsquelle kann insbesondere in einem Winkel $> 0 \leq 180^\circ$ zu der Detektionseinheit eingestrahlt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoreinheit als Multidetektoreneinheit ausgebildet ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Messung der zeitlichen Aufenthaltsdauer fluoreszenzmarkierter Moleküle durch Ausleuchtung und/oder konfokaler Abbildung kleiner Volumenelemente lässt sich durch unterschiedliche Vorrichtungen realisieren. Die in P 43 42 703 beschriebene Vorrichtung mit Elementen der konfokalen Laserspektroskopie ist eine bevorzugte Möglichkeit.

Allerdings ist die Einsetzbarkeit der Vorrichtung technisch eingeschränkt:

- Es lassen sich nur Objekte analysieren, die in der optischen Meßvorrichtung als Probe zugänglich gemacht werden können.
- Die teuren Herstellkosten der Meßvorrichtung sind hinderlich.
- Die Gerätedimension ist unhandlich und eignet sich z.B. wenig für transportable Geräte.
- Eine massive Parallelisierung von Meßvolumina ist aufwendig.
- Es werden kostspielige Lasersysteme verwendet.
- z.B. zur Messung bei höheren Konzentrationen sind

Meßvolumina $>\lambda$ zu groß.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung setzt zur Lösung des oben genannten Nachteils eine integrierte Optik mit integrierten Laserlichtquellen (Laserdioden) ein. Hiermit ergeben sich Möglichkeiten, wie sie apparativ durch die Methoden der Nahfeldmikroskopie gegeben sind.

Wichtige Aspekte der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) sind

- die konfokale Anordnung des Anregungsvolumens und des Meßvolumens bei möglichst kleinen Volumina ($<<10^{-12}$ l)
- Die Auswertung des Lichtsignals durch Korrelationsmethoden unter Berücksichtigung der Diffusionszeiten der Translation und/oder der Rotation eines Moleküls im Meßvolumen.

Bisher werden diese Anforderungen durch einen Aufbau unter Verwendung eines konfokalen Mikroskopes verwirklicht. Die Verwendung miniaturisierter Bauelemente oder die monolithische Integration vereinfachen die Meßanordnung.

- Der erfindungsgemäße miniaturisierte Aufbau, wie er in der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Ausdruck kommt, bezieht sich auf ein Substrat, in dem Anregungs- und Detektioneinheit konfokal integriert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Substrat einen Kanal in Form einer Kapillare oder eines Spaltes auf, in den die zu untersuchende Flüssigkeit gegeben wird. Dort wird sie statisch oder im kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Fluß analysiert. Eine solche Anordnung lässt sich typischerweise mit den aus der Halbleitertechnik bekannten chemischen oder Laser-Ätzverfahren herstellen, aber auch durch das LIGA-Verfahren. Dabei können sämtliche mit der Herstellungstechnik kompatible Materialien zur Anwendung kommen. Um den Kanal

werden Anregungs- und Detektionseinheit konfokal gruppiert. Der Winkel zwischen den optischen Achsen der Anregungs- und der Detektionseinheit ist beliebig, solange sich die Achsen im gemeinsamen Brennpunkt schneiden.

Mit der erfindungsgemäßen Methode lassen sich sehr niedrige Konzentrationen ($<10^{-12} M$) fluoreszierender Moleküle bestimmen. Das Verfahren wird jedoch umständlich und weniger praktikabel, wenn zu viele Zeiteinheiten bei unveränderten Raumkoordinaten eines oder mehrerer Meßvolumen abgewartet werden muß, bis zufällig ein zu messendes Molekül das Raumelement des Meßvolumens passiert. Dieses Problem ist auch bei höheren Konzentrationen von Bedeutung ($>10^{-12} M$), wenn die Diffusionszeiten sehr klein sind, wie dies z.B. bei Zellen und zellgebundenen Molekülen der Fall ist. Hier kann das Verfahren erfindungsgemäß so durchgeführt werden, daß dem eigentlichen Meßverfahren ein Scan-Prozeß vorgeschaltet ist, bei dem die Raumkoordinaten solange in zeitlich kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Art variiert werden, bis ein Signal der gewünschten Qualität erfaßt wird, z.B. das gemeinsame Auftreten einer korrelierten Fluoreszenz aus zwei Farben bei Verwendung der Kreuzkorrelationsmethode. Ist ein Meßsignal erfaßt, wird erfindungsgemäß der Meßvorgang gestartet. Die Verweilzeit eines Scanvorgangs kann weniger als eine Millisekunde pro Meßvorgang betragen, um festzustellen, daß das einzelne Meßvolumen oder die parallel vermessenen Meßvolumina kein Molekül der gewünschten Charakteristik beinhaltet. Bei dieser Vorgehensweise ist zu beachten, daß die durchschnittlichen charakteristischen Diffusionszeiten in ihrer absoluten Größe auf berechenbare Weise beeinflußt werden. Dies geschieht dadurch, daß z.B. fixierte Moleküle (z.B. auf fixierten Bakterienzellen) direkt und ausschließlich die zeitliche Variation der Veränderung der Raumkoordinaten des Meßvolumens wiedergeben, oder bei beweglichen kleinen Molekülen und sprunghafter Veränderung der Raumkoordinaten ca. die Hälfte der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer, da die Moleküle sich bei Beginn des Meßvorgangs

bereits innerhalb des Meßvolumens befinden.

Scanning-Prozesse, die der eigentlichen Messung vorgeschaltet sind, sind dann bevorzugt, wenn Zellpopulationen analysiert werden sollen, wobei nur ein Bruchteil der Zellen Moleküle oder Molekülkomplexe mit den gewünschten Meßeigenschaften tragen. Dies ist z.B. bei der Analyse evolutiv herstellter Mutantenpopulationen rekombinanter Zellen der Fall, aber auch bei der Analyse mütterlichen Blutes auf die Anwesenheit kindlicher, kernhaltiger Erythrozyten, die auf bestimmte Erbanlagen oder Chromosomenanomalien analysiert werden sollen.

Weitere Anwendungsbeispiele sind die funktionale Genomanalyse durch Verwendung von Phagen- oder Bakterien-Displaysystemen, sowie entsprechende Anwendungen in der evolutiven Biotechnologie. In beiden Ausführungsformen geht es um die Detektion und gezielte Selektion von Zellen oder Phagen mit spezifischen Bindungseigenschaften zu bestimmten Liganden vor einem Hintergrund nicht-reagierender Phagen oder Bakterien.

Die Anzahl durchgemusterter Volumenelemente steigt somit erheblich. In Kombination mit Kreuzkorrelation lassen sich somit im μ s bis nano-Sekundenbereich, im Einzel- und Multiarraybetrieb, viele Volumenelemente durchmustern. Die Verschiebung wird nur unterbrochen, wenn sich im erfaßten Volumenelement z. B. verschieden "farbige" Signale korreliert nachweisen lassen. Dann wird die Translationsdiffusionskonstante bestimmt. Diese Zeit ist um ein zu errechnendes Zeitelement (50 %) statistisch kürzer, verglichen mit dem Fall, daß ein Teilchen in das Volumenelement von sich aus oder durch erzwungene Diffusion eindringen muß. Ist ein Teilchen einmal erfaßt, kann es auch durch Scanning der unmittelbaren Umgebung ein zweites Mal erfaßt werden.

Die parallele Ausleuchtung mehrerer Volumenelemente mit konfokaler Optik ist bekannt. Parallelle Ausleuchtung von

Meßvolumina, deren relative Abstände im μm -Bereich liegen, gelingt durch die beschriebenen Vorrichtungen nicht oder nur unbefriedigend. Die erfindungsgemäß gewünschten Ausleuchtungen mit einer Dimensionierung im unteren μm -Bereich und darunter gelingt erfindungsgemäß durch Verwendung holographischer Gitter. Parallel können umfangreiche Arrays kleiner Volumenelemente durch Einsatz holographischer Gitter oder binärer optischer Elemente ausgeleuchtet werden.

Die Meßvolumina werden erfindungsgemäß konfokal entweder über die Verwendung mehrerer Löchblenden in Objektebene, durch Positionierung von Multidetektorelementen in Objektebene oder durch Einsatz von Lichtfaserbündeln mit Einkopplung des Lichtes in Objektebene und Übertragung der Photonen-Detektoren auf Fluoreszenzeigenschaften darin enthaltener Moleküle vermessen.

Bei der hochparallelisierten Ausleuchtung von kleinen Volumenelementen stellt sich das Problem der Registrierung der emittierten Fluoreszenzsignale aus den einzelnen Volumenelementen.

In der WO-A-94/16313 ist beschrieben, daß es möglich ist, kleine Raumelemente parallel auszuleuchten und die jeweiligen Fluoreszenzsignale individuell durch die Verwendung konfokaler Lochblendensysteme in Objektebene auf Multidetektoren abzubilden oder die Signale an der Position und anstelle der Lochblenden in Lichtleiter einzukoppeln und auf Detektorelemente zu leiten oder die Multidetektoren anstelle und in der Position der der Lochblenden selbst zu positionieren. Es wird auch die Möglichkeit beschrieben, ein größeres Volumenelement auszuleuchten und mit den oben beschriebenen konfokalen, parallelen Abbildungen kleiner Untervolumenelemente zu kombinieren.

Bei hoher Parallelisierung werden jedoch die Anforderungen an die Anzahl der Detektorarrays und der mit der parallelen

Verarbeitung auflaufender Daten verbundene Rechenaufwand erheblich. Erfindungsgemäß werden diese Probleme dadurch gelöst, daß in einer weiteren Form der Koppelung kleiner, parallel ausgeleuchteter Raumelemente mit einer Registriervorrichtung die Signale über mehrere Raumelemente hinweg integriert erfaßt werden. Diese Vorgehensweise ist insbesondere bei solchen Anwendungen von Nutzen, bei denen

- eine Vielzahl von Volumenelementen durchgemustert werden sollen
- der Rechenaufwand zugunsten der eingesetzten Rechenkapazität und der Rechendauer minimiert werden soll
- die Anzahl der pro Messung erfaßten Volumenelemente und somit das vermessene Gesamtvolumen maximiert werden soll
- Signale von Molekülen, Molekülkomplexen oder Zellen in hoher Verdünnung analysiert werden sollen
- die Präzision der ortsaufgelösten Erfassung von untergeordneter Bedeutung ist
- die Anzahl der ausgesandten Lichtquanten während der Diffusion durch ein einzelnes Raumelement für eine Korrelation ausreichend ist.

Die Figur 1 zeigt in schematischer Form eine Aufsicht auf eine bevorzugte Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wie sie unter Verwendung der Nahfeldmikroskopie Verwendung findet.

Die Figur 2 zeigt einen Schnitt durch die in Figur 1 gezeigte Ausführungsform längs der Linie II---II'. In dem Substrat 1, das beispielsweise ein Siliciumwafer sein kann, wird eine Kavität in Form einer Kapillare oder eines Kanals 2 geätzt. Die an einer Seite der Kapillare oder dem Kanal 2 angeordnete Laserdiode 3 ist von der Kapillare oder dem Kanal 2 durch eine Blende 4 getrennt. Unterhalb der Kapillare ist ein Detektor 5 angeordnet, der ebenfalls durch eine Blende 4 von der Kapillare oder dem Kanal 2 getrennt ist. Steuereinheiten

wie der Detektor-Controller 6, der insbesondere die Spannungsversorgung des Detektors übernimmt, bzw. der Laserdiodentreiber 7 sind ebenfalls auf dem Chip integriert und mit den anzusteuernden Einheiten leitend verbunden. Vorzugsweise besteht die Blende 4 aus einem "pin-hole" (Lochblende) oder einem Spalt, dessen Größe kleiner ist als die Wellenlänge der verwendeten Excitationsstrahlung.

Die Figur 3 zeigt ebenfalls in schematischer Form eine Aufsicht auf eine weitere bevorzugte Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Figur 4 zeigt einen Schnitt durch die in Figur 3 gezeigte Anordnung längs der Linie IV---IV'. Hier wird das von der Laserdiode 3 emittierte Licht durch eine Kollimationsoptik 8 (Mikrolinse) in einen Wellenleiter 9 eingekoppelt, an dessen Ende sich z. B. eine zweite Mikrolinse 8 befindet. Letztere erzeugt den Fokus in dem Kanal 2, der mit dem durch die Blende 4 begrenzten Detektionsvolumen des Detektors 5 überlappt.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Bestimmung stoffspezifischer Parameter eines oder weniger Moleküle mittels Korrelations-Spektroskopie, wobei das Molekül in einer Probe, in der das (die) zu bestimmende(n) Molekül(e) in relativ hoher Konzentration vorhanden ist (sind), oder die Moleküle durch elektromagnetische Strahlung (Excitationsstrahlung) zur Abgabe von elektromagnetischer Strahlung (Emissionsstrahlung) angeregt wird oder werden, wobei die Excitations- und/oder Emissionsstrahlung eine für die entsprechende Wellenlänge dieser elektromagnetischen Strahlung durchlässige Einrichtung passiert, die zwischen einer Excitations- oder Emissionsstrahlungsquelle und einem Excitations- oder Emissionsstrahlungsdetektor angeordnet ist, wobei die Einrichtung zum Durchlassen elektromagnetischer Wellen mindestens einen Bereich aufweist, dessen größte Ausdehnung in mindestens einer Raumrichtung kleiner ist als die Wellenlänge der Excitations- und/oder Emissionsstrahlung des Moleküls oder der Moleküle.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für elektromagnetische Strahlung durchlässige Einrichtung Bereiche in Form von Lochblenden oder Spaltblenden aufweist.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die für elektromagnetische Strahlung durchlässige Einrichtung Bereiche aufweist, die durch Lichtleiter mit fokussierenden optischen Elementen, wie Mikrolinsen, Gradientenindexlinsen oder binären optischen Elementen optisch koppelbar und/oder in den Lichtleiter integrierbar sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, wobei die elektromagnetische Strahlung der Emission und/oder Excitation Frequenzen hat, die im typischen Bereich der Chemilumineszenz, Kernfluoreszenz und Röntgenfluoreszenz liegt.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Wechselwirkung der Chemilumineszenz über Koppelung mit anderen physikalischen Effekten wie kernmagnetische Resonanz, elektrischen, magnetischen und elektromagnetischen Feldern (Spektrallinienaufspaltung), Frequenzverdoppelung (SHG, THG), Summen- und Differenzfrequenz, Vibrationseffekte, Koppelung mit Phononen der umgebenden festen Phase beispielsweise Oberflächenplasmonen als Emissionsstrahlung gemessen wird, oder wobei eine Kombination mit atomic force microscopy erfolgt.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Excitationsstrahlung von einer Einheit geliefert wird, die ein Halbleiterlaser oder ein frequenzvervielfachter Halbleiterlaser ist, wobei die erzeugten Lichtpulse gegebenenfalls mittels Wellenleitern, wie Glasfasern verstärkt sind.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Emissionsstrahlung von einer als Photodiode geschalteten pin-Schicht, Lawinenphotodioden oder Photomultiplier detektiert wird.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Quelle der zu detektierenden Strahlung, der Detektor der Strahlung, die Optik und Schaltungselemente auf einem Substrat angeordnet sind.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei eine Anzahl von Detektoren so angeordnet ist, daß das als Quelle der Emissionsstrahlung dienende Molekül

bei Passieren der Detektoren in zeitlicher Korrelation mit dem Passieren beobachtet wird.

10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Anregung elektromagnetische Strahlung mit Energien zwischen 284 und 543 eV verwendet wird.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausleuchtung von Meßvolumina durch Verwendung von holographischen Gittern oder binären optischen Elementen erfolgt.
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Emissionsstrahlung mindestens zweier Raumelemente integriert erfaßt wird.
13. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 mit einer auf einem Substrat angeordneten Excitationsstrahlungsquelle, einer im Strahlengang der Excitations- und/oder Emissionsstrahlung befindlichen für die entsprechende Wellenlänge dieser elektromagnetischen Strahlung durchlässigen Einrichtung, einem Detektor für elektromagnetische Strahlung, die insbesondere durch Emission hervorgerufen wird, und elektronischer Schaltelemente gegebenenfalls mit Auswertungseinheiten zur Analyse emittierter elektromagnetischer Strahlung.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, wobei die für elektromagnetische Strahlung durchlässige Einrichtung Bereiche in Form von Lochblenden oder Spaltblenden aufweist.
15. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 14, wobei die für elektromagnetische Strahlung durchlässige Einrichtung Bereiche aufweist, die durch Lichtleiter mit fokussierenden optischen Elementen, wie

Mikrolinsen, Gradientenindexlinsen oder binären optischen Elementen optisch koppelbar und/oder in den Lichtleiter integrierbar sind.

16. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15, wobei das Substrat ein Siliciumwafer ist.
17. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei der Detektor als Photodetektor ausgestaltet ist und am Boden eines das Substrat durchziehenden Kanals angeordnet ist und die Excitationsstrahlungsquelle in einem $0^\circ < \text{Winkel} < 180^\circ$ zu der Detektioneinheit eingestrahlt werden kann.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoreinheit als Multidetektoreneinheit ausgebildet ist.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat ein piezo-elektrisches Element ist.
20. Verwendung einer Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 mit einer auf einem Substrat angeordneten Excitationsstrahlungsquelle, einem Detektor für elektromagnetische Strahlung, die insbesondere durch Emission hervorgerufen wird, und elektronischer Schaltelemente, gegebenenfalls mit Auswertereinheiten zur Analyse emittierter elektromagnetischer Strahlung.

1 / 2

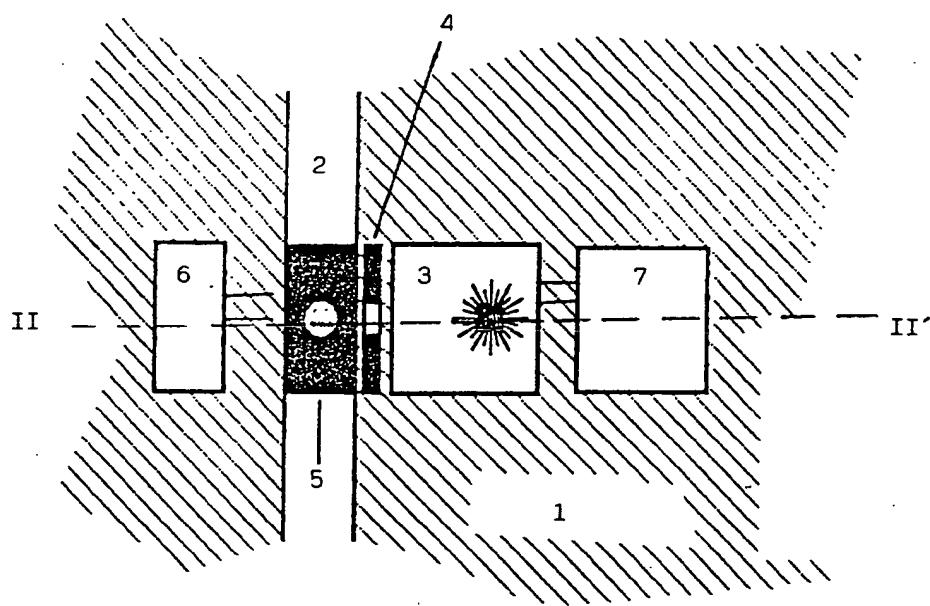


Fig. 1

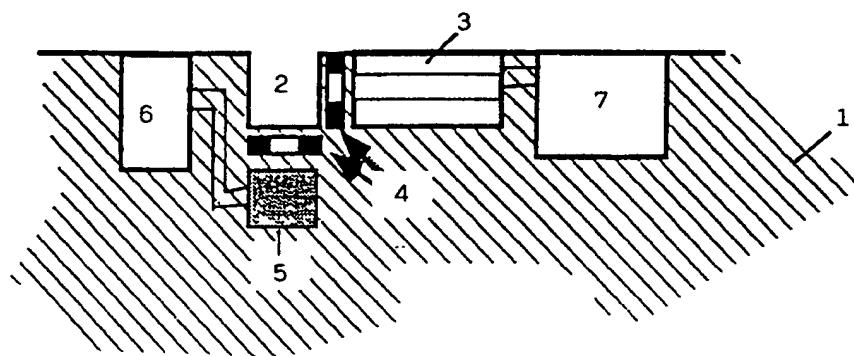


Fig. 2

2 / 2

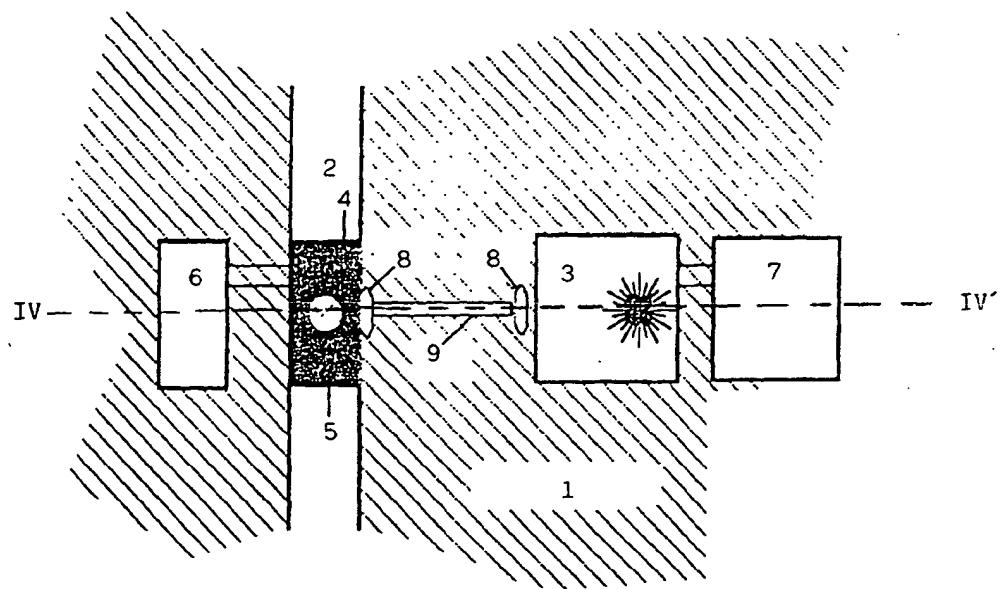


Fig. 3

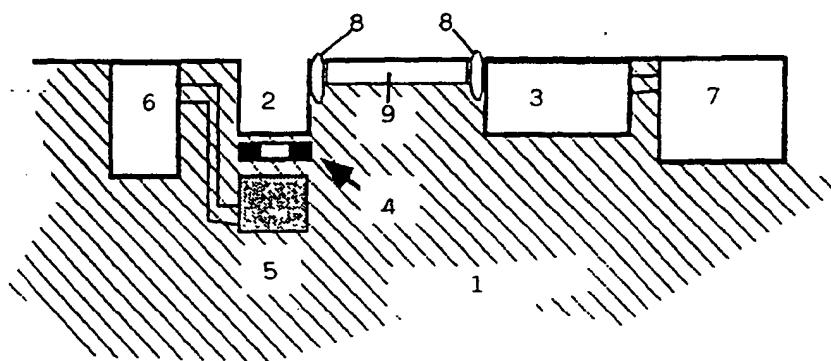


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.